

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, C07H 1/08, B01D 21/26		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30685
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juli 1998 (16.07.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00103		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 1998 (09.01.98)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 97100331.4 10. Januar 1997 (10.01.97) EP			
(34) Länder für die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang [DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			
(54) Title: PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF DNA BY CROSS-FLOW FILTRATION, SEPARATION OF ENDOTOXINS FROM A NUCLEIC ACID PREPARATION			
(54) Bezeichnung: REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION, ABTRENNUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a method of purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution, the solution containing nucleic acid being guided tangentially past one or a plurality of semipermeable membranes, such that the nucleic acid molecules are retained by the membranes and substances having a lower molecular weight can pass through the membranes and/or be adsorbed thereat, so that a purified and/or concentrated nucleic acid solution is obtained. The same method is carried out to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention further concerns the use of a cross-flow filtration system for purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution and for separating endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention also concerns the use of the nucleic acids purified and/or concentrated by the cross-flow filtration system for cloning, transformation, transfection and microinjection into cells, for use in gene therapy processes, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR).</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, wobei man die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeileitet, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und an der Membran adsorbiert werden und man eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhält. In derselben Weise wird zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation verfahren. Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung sowie zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation. Ferner die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION, ABTREN-
NUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung
oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung,
ein Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer
Nucleinsäure-Präparation sowie die Verwendung einer Cross-
10 Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrie-
rung von Nucleinsäuren in einer Lösung und zur Abtrennung von
Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation.

Im Bereich der Molekularbiologie sind Nucleinsäure-Aufreini-
15 gungsverfahren gebräuchliche Methoden. In aus dem Stand der
Technik bekannten Verfahren wird z. B. das gewonnene biolo-
gische Material, beispielsweise E.coli Bakterienzellen, nach
dessen Aufschluß (üblicherweise Lyse mit Lysozym oder Ultra-
schall) abzentrifugiert und der Überstand wird mit Phenol
20 ausgeschüttelt. Anschließend wird an einem Cäsiumchlorid-Gra-
dienten eine Ultrazentrifugation durchgeführt (Birnboim &
Doly, Nucl. Acid Res. 7 (1979) 1513 - 1523, Garger et al.,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 117 (1983) 835-842). Derartige
Präparationen enthalten jedoch im allgemeinen als Verunreini-
25 gungen bakterielle Endotoxine, Phenol, Cäsiumchlorid und/oder
Ethidiumbromid.

Endotoxine sind Bakterientoxine, die bei allen Enterobacteria-
ceae, z. B. Salmonella, Shigella und E.coli zu finden sind. In
30 Säugern wirken Endotoxine als Pyrogen und rufen neben Fieber
zahlreiche weitere pathologische Wirkungen hervor. Für die to-
xische Wirkung der Endotoxine ist insbesondere der Bestandteil
Lipid A verantwortlich.

35 Ein anderes Verfahren zur Aufreinigung von Nucleinsäuren ist
im QIAGEN® Plasmid-Handbook (Qiagen Inc., Chatsworth, USA) und
der EP-B 0 268 946 beschrieben. Danach wird das nach üblichem

Aufschluß gewonnene Zell-Lysat an QIAGEN®-TIP, welches QIAGEN® resin (ein Trägermaterial auf Silicagelbasis) enthält, chromatographiert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß DNA-Bindeproteine nicht vollständig von der DNA abgelöst werden, so daß die erhaltene Plasmid-Präparation Proteine und insbesondere Endotoxine (z. B. aus der Membran der E.coli-Zelle) in beträchtlichem Umfang enthält.

In einem weiteren Nucleinsäure-Aufreinigungsverfahren wird nach alkalischer Lyse des biologischen Materials, beispielsweise E.coli-Zellen, nach Birnboim & Doly eine Chromatographie des Zentrifugationsüberstandes, unter Hochsalzbedingungen über Anionentauschersäulen (z. B. Mono-Q, Source-Q von Pharmacia, Macroprep-Q von Biorad, Poros-Q von Perspektive Biosystems oder HyperD-Q von Biosepra, vgl. Chandra et al., *Analyt. Biochem.* 203 (1992) 169-172; Dion et al., *J. Chrom.* 535 (1990) 127-147) durchgeführt. Auch nach diesem Reinigungsschritt enthält die Plasmid-Präparation noch Verunreinigungen wie Proteine und insbesondere in beträchtlichem Umfang Endotoxine.

In noch einem weiteren Verfahren zur Aufreinigung von Nucleinsäuren wird nach alkalischer Lyse und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion eine Chromatographie über Gelfiltration durchgeführt (McClung & Gonzales, *Analyt. Biochem.* 177 (1989) 378-382; Raymond et al., *Analyt. Biochem.* 173 (1988) 124-133). Auch dieses Reinigungsverfahren kann die Verunreinigungen nicht vollständig aus der Plasmid-Präparation entfernen.

Den genannten Aufreinigungsmethoden ist ein abschließender Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt gemeinsam. Üblicherweise wird dabei eine Isopropanol/Ethanol-Fällung der Nucleinsäure mit anschließender Zentrifugation und Resuspension des Nucleinsäure Pellets in Puffer angewendet (vgl. z. B. Sambrook J. et al. (1989), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Hierbei wird beispielsweise eine DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 4 M LiCl und anschließend mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur

versetzt. Anschließend wird der sich bildende Niederschlag der Nucleinsäure abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet, das die Nucleinsäure enthält, wird in einem folgenden Schritt in 70%igem Ethanol aufgenommen, nochmals zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und nach Trocknung des Pellets wird dieses in einem gewünschten Puffer resuspendiert. Die Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode ist jedoch nur für Anwendungen im Labor praktikabel, wo mit relativ kleinen Volumina gearbeitet wird.

10

Abgesehen von der Beschränkung auf kleine Volumina hat die beschriebene Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode noch weitere erhebliche Nachteile. So ist es aus Gründen der Betriebssicherheit und des Umweltschutzes sehr ungünstig, die im industriellen Prozeßmaßstab nötigen Isopropanol/Ethanol-Volumina zu verwenden. Außerdem erfüllt die Isopropanol/Ethanol-Fällungsmethode nicht die technischen Voraussetzungen, um therapeutisch verwendbare Nukleinsäuren bereitzustellen, da in der Nucleinsäure-Lösung enthaltene Endotoxine mit dieser Methode nicht vollständig entfernt werden können.

In der WO 95/21177 wird ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren für den Einsatz in der Gentherapie beschrieben, wobei die Reinigung im wesentlichen durch Zentrifugieren, Filtrieren, eine Affinitätschromatographie oder eine Chromatographie an einem anorganischen Chromatographiematerial und eine Chromatographie an einem Ionenaustauscher erfolgt. Zur Abreicherung von Endotoxinen wird die Nucleinsäure mit einem "Endotoxin Removal Buffer", der 10 % Triton® X 100 und 40 mmol/l MOPS-Puffer (3-Morpholino-1-Propansulfonat) enthält, behandelt. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die auf diese Weise gereinigte Nucleinsäure Verunreinigungen der pharmakologisch nicht unbedenklichen Substanzen Triton® und MOPS enthält. Außerdem kann zwar eine Abreicherung von Endotoxinen auf einen Gehalt von ca. 100 EU/mg DNA erreicht werden (QIAGEN News 1-96, 3-5), eine weitergehende Entfernung von Endotoxinen ist jedoch nicht mög-

lich. Für eine therapeutische Anwendung, wie sie beispielsweise für die Gentherapie vorgesehen ist, werden jedoch Nucleinsäure-Präparationen mit noch höherer Reinheit benötigt, die möglichst frei von allen Verunreinigungen (insbesondere weitestgehend frei von Endotoxinen) sind. Vor allem der Endotoxingehalt von Plasmid-DNA-Präparationen stellt bisher ein nicht gelöstes Problem dar, wie beispielsweise von Cotten et al., Gene Therapy 1 (1994) 239 - 246 beschrieben wurde.

- 10 K.-G. Wahlund und A. Litzén (Journal of Chromatography, 461 (1989), 73-87; 476 (1989), 413-421) beschreiben ein als "Field Flow Fractionation" (FFF) bezeichnetes für analytische und mikropräparative Anwendungen geeignetes Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen und Plasmiden entsprechend dem je-
15 weiligen Molekulargewicht. Die Ultrafiltrationsmembran wird wie bei einer Cross-Flow-Filtration tangential angeströmt, jedoch basiert die Trennung im Unterschied zur Cross-Flow-Filtration auf der unterschiedlichen Migration der Moleküle im Trägerfluidstrom. Die zu trennenden Moleküle eluieren somit in
20 Abhängigkeit ihrer Molekülgröße und dem damit korrelierenden Diffusionskoeffizienten. Die Trennung erfolgt nicht kontinuierlich, d.h. die aufzutrennenden Moleküle überströmen die Membran während des Trennvorgangs nur ein einziges Mal.
- 25 F.M. Fernandez, J.M. Romano und M.A. Otero (Acta Biotechnol. 12 (1992) 1, 49-56) beschreiben die Konzentrierung von RNA in Lösung in einem Cross-Flow-Filtrationsverfahren mit Hohlfasermembranen. Die Reinigung von DNA oder Plasmid-DNA wird jedoch weder beschrieben noch nahegelegt.
- 30 G.W. Rembhotkar und G.S. Khatri (Analytical Biochemistry, 176, 337-374 (1989)) beschreiben die Reinigung von λ -Phagenlysat mittels "Tangential Flow Filtration". Eine daran anschließende λ -Phagen DNA Präparation erfolgt mit gebräuchlichen Me-
35 thoden unter Verwendung von Chlorophorm, Phenol-Chlorophorm-Behandlung und Ethanol-Präzipitation.

In WO96/36706 und 96/02658 A1 wird ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen beschrieben, die im großtechnischen Maßstab hergestellt wurden. Die Zellen werden durch Zugabe einer Lyselösung und Erhitzen auf 70°C bis 100°C in einem Durchflußwärmetauscher aufgeschlossen und anschließend wird ein klarer Zellüberstand durch chargenweise Zentrifugation und Diafiltration erhalten. Die Diafiltration erfolgt dabei im "Dead-End-Modus", jedoch nicht durch tangentialen Überströmen der Membran entsprechend einem Cross-Flow-Fraktionsverfahren. Danach erfolgt eine weitere Reinigung über Anionenaustauscherchromatographie und Reversed Phase HPLC. In diesem Verfahren wird lediglich der Zellaufschluß in einem kontinuierlichen Verfahrensschritt durchgeführt, die weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt chargenweise in gebräuchlichen Zentrifugen und Diafiltrationsvorrichtungen.

In EP-A 96 101 628.4 wird vorgeschlagen, Nucleinsäure-Präparationen über Anionenaustauscher mittels eines Hochsalzgradienten zu reinigen, um Nucleinsäure-Lösungen zu erhalten, die einen Proteingehalt von weniger als 0,1 % haben, frei von Verunreinigungen, wie etwa Ethidiumbromid, Phenol, Cäsiumchlorid und Detergenzien sind und die weitgehend frei von Endotoxinen sind.

25

Aus dem Stand der Technik sind somit weder Verfahren bekannt, die es ermöglichen große Nucleinsäuremengen zu reinigen oder zu konzentrieren, noch sind Verfahren bekannt, mit denen Nucleinsäuren in großen Mengen und in hochreiner Form, insbesondere frei von Endotoxinen, die für eine therapeutische Verwendung geeignet sind, bereitzustellen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es daher, ein Reinigungs- und Konzentrationsverfahren bereitzustellen, das es auf einfache Weise ermöglicht, Nucleinsäuren in großen Mengen aufzureinigen. Eine weitere der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, die Konzen-

tration an Endotoxinen in einer Nucleinsäure-Präparation soweit zu reduzieren, daß sie für den therapeutischen Einsatz geeignet ist.

5 In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet
10 wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können, wobei eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.

15

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Nucleinsäure enthaltende Präparation tangential an
20 einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und von der Membran adsorbiert werden, wobei eine im wesentlichen
25 endotoxinfreie Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.

Es wurde nun festgestellt, daß sich mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung unter Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage Nucleinsäure-Lösungen reinigen und konzentrieren lassen. Überraschend und neu ist dabei insbesondere, daß
30 die Nucleinsäuren durch die Cross-Flow-Filtration (CFF) nicht geschädigt werden. Man ging bisher immer davon aus, daß die bei der CFF auftretenden Scherkräfte zu Schädigungen von Nucleinsäuren, insbesondere zu Strangbrüchen führen würden.
35 Deshalb wurde die CFF bisher nur zur Konzentrierung und Diafiltration von Proteinen eingesetzt. Außerdem können mit dem Verfahren der Erfindung nicht nur Nucleinsäuren in großen Men-

gen und gewünschter Reinheit erhalten werden, sondern das Verfahren der vorliegenden Erfindung vermeidet auch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, was in toxikologischer Hinsicht sowie unter Sicherheits- und Umweltaspekten von großem Vorteil ist.

Überraschenderweise wurde darüber hinaus festgestellt, daß mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung auch Nucleinsäure-Präparationen gewonnen werden können, die weitgehend von Verunreinigungen, insbesondere von Endotoxinen, befreit sind, so daß sie in therapeutischen Verfahren oder Anwendungen eingesetzt werden können. Damit löst das vorliegende Verfahren ein Problem, das durch den stark steigenden Mengenbedarf an therapeutisch einsetzbaren Nucleinsäuren, insbesondere an therapeutisch einsetzbarer DNA entstanden ist und erwartungsgemäß in Zukunft weiter ansteigen wird.

Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung werden lineare oder zirkuläre Nucleinsäuren, vorzugsweise Plasmid-DNA und am meisten bevorzugt zirkuläre Plasmid-DNA gereinigt oder/und konzentriert. Die Größe der Nucleinsäure liegt dabei vorzugsweise im Bereich von ≥ 150 Basenpaaren, besonders bevorzugt im Bereich von 1 kbp - 200 kbp. Die Nucleinsäure kann in dem erfindungsgemäßen Verfahren chargenweise gereinigt oder/und konzentriert werden, vorzugsweise wird das Verfahren kontinuierlich durchgeführt. Jede Volumengröße kann prozessiert werden, wobei vorzugsweise eine Lösung mit einem Volumen von 1 bis 10.000 l, besonders bevorzugt mit 1 - 100 l aufgearbeitet wird. Die die Nucleinsäuren enthaltende Lösung wird unter geeigneten Druckbedingungen an der oder den Membranen vorbeigeleitet, wobei der Überströmdruck vorzugsweise größer als der Transmembrandruck ist. Besonders bevorzugt wird unter einem Transmembrandruck von 0,2 bis 3,0 bar, am meisten bevorzugt von 0,8 - 1,5 bar gearbeitet, wobei der Überströmdruck größer als der Transmembrandruck ist. Die Retentatfließrate (RF) kann über einen weiten Bereich variiert werden, vorzugsweise wird mit einer RF von 100 l/h·m² bis 4.000 l/h·m² gearbeitet. Das

Verfahren kann auch bei variierenden Temperaturen durchgeführt werden, vorzugsweise wird in einem Temperaturbereich von 4° C - 25° C gearbeitet.

- 5 Um die Nucleinsäuren enthaltende Lösung von niedermolekularen Verunreinigungen und insbesondere von Endotoxinen zu trennen, werden gebräuchliche Membranen, wie etwa Membranen aus Polyethersulfon (PES) modifiziertem PES, Polyvinylidendifluorid (PVDF), Cellulosetriacetat oder regenerierter Cellulose verwendet. Ebenfalls für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind Hohlfaserwickelmodule. Vorzugsweise werden Membranen mit einer Ausschlußgröße von 1 - 1000 Kilodalton (kD), mehr bevorzugt von 10 - 300 kD und am meisten bevorzugt von 10 - 100 kD, verwendet. Der Endotoxinabreicherungsfaktor (Endotoxingehalt 15 der Nucleinsäure-Präparation vor Cross-Flow-Filtration zu Endotoxingehalt der Nucleinsäure-Lösung nach Cross-Flow-Filtration), der in dem vorliegenden Verfahren erreicht wird, beträgt dabei mindestens 10 : 1, vorzugsweise mindestens 200 : 1. Der Endotoxingehalt der Lösung ist nach der Cross-Flow-Filtration sehr gering, er beträgt vorzugsweise < 0,1 EU/mg 20 Nucleinsäure. Die in dem vorliegenden Verfahren erhaltenen Nucleinsäuren sind im wesentlichen unbeschädigt und weisen im wesentlichen keine Einzel- oder Doppelstrangbrüche auf.
- 25 Insbesondere zeigt eine erfindungsgemäß gereinigte Plasmid-DNA nach gelektrophoretischer Auftrennung nur eine dominante Bande, die der Konformation "Covalently Closed Circle" entspricht. Des weiteren sind neben geringen Anteilen der Konformationen "Open Circle" und "Linearized Circle" keine weiteren Banden vorhanden. 30

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer 35 Lösung.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfin-

10 dung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur
Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation.

 In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorhergehende Er-
s findung die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration ge-
 reinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren,
 zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in
 Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-
 Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

10

Beispiele

 In den beschriebenen Versuchen wurden Membranen des Typs "OME-
GA" aus modifiziertem Polyethersulfon der Firma Filtron (Best-
15 Nr. δS 100CO1 Ausschlußgrenze 100 kD), Membranen aus Cellulo-
 seacetat der Firma Sartorius oder PVDF Membranen der Firma
 Millipore verwendet. Insbesondere zur Endotoxinabtrennung
 wurde eine Membran mit der Ausschlußgrenze von 100 Kilodalton
 verwendet. Zur Überprüfung der Abtrennung von Endotoxinen
20 wurden als Aufstocklösung E-Toxate® der Firma Sigma (Bestell-
 Nr.: 210) verwendet. Die Prüfung auf Endotoxine erfolgte nach
 der "Festgel-Methode", in der die Zugabe einer endotoxinhalti-
 gen Lösung zu einer Limulus-Amöbozyten-Lysat-Lösung (LAL-Lö-
 sung) eine Gelbildung des Gemisches verursacht. Der Gelbildung
25 liegt eine in mehreren Schritten ablaufende Gerinnungskaskade
 zugrunde.

1. Cross-Flow-Filtration (CFF) einer Plasmid-DNA-Lösung

30 Zur Überprüfung der CFF als Methode zur Konzentrierung von
 Plasmid-DNA wird ein Produktionsansatz von 2.000 g E.coli-
 Biomasse durch eine Alkali-Lyse aufgeschlossen, über Q-Sepha-
 rose und Hydroxylapatit-Chromatographie prozessiert, und die
 erhaltene Plasmid-DNA-Lösung als Ausgangslösung in die CFF
35 eingesetzt.

1.1. Herstellung einer Ausgangslösung

2.000 g feuchte E.coli Biomasse wird aus dem Fermenter in entpyrogenisierte Zentrifugenbecher abgefüllt. Es werden 22,5 l Resuspensionspuffer (50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l EDTA- Na_2 , pH $8 \pm 0,2$) zugegeben und mindestens 24 Stunden bei $5 \pm 4^\circ \text{C}$ langsam (ca. 35 RPM) gerührt, bis die Biomasse vollständig suspendiert ist. Dabei wird die Temperatur der Suspension langsam auf 25°C erhöht.

10

Zur Suspension werden 22,5 l 0,2 mol/l NaOH, 1 % SDS unter Rühren mit ca. 80 RPM zugegeben und bei 25°C 5 Minuten inkubiert. Es werden 22,5 l Kaliumacetatpuffer (3 mol/l Kaliumacetatpuffer pH 5,5) unter Rühren zugefügt und die Temperatur der Biomasse möglichst schnell auf 4°C abgesenkt. Die Biomasse wird für 30 Minuten bei 26.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird isoliert und über eine 5 μm Filterkerze klarfiltriert.

Im nächsten Schritt wird eine Chromatographie an Q-Sepharose durchgeführt. Der dekantierte Zentrifugenüberstand wird durch Zugabe von TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA pH $8,5 \pm 0,2$) auf 49 - 50 mS/cm Leitfähigkeit eingestellt und auf $5 \pm 4^\circ \text{C}$ abgekühlt. Die gesamte Chromatographie wird bei dieser Temperatur durchgeführt. Der Zentrifugationsüberstand wird auf die aquilibrierte Säule aufgezogen. Anschließend wird die Säule mit ca. 8 SV 10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mol/l NaCl pH $8,5 \pm 0,2$ gewaschen.

Zur Elution wird an die Säule ein Gradient (5 SV Puffer A (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,65 mmol/l NaCl pH $8,0 \pm 2$), 5 SV Puffer B (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,85 mol/l NaCl pH $8,0 \pm 0,2$)) angelegt und das Eluat bei einer Flußrate von 5 bis 8 SV/h fraktioniert, die Detektion erfolgt bei 254 nm. Der Vorpeak (Verunreinigungen) wird vom Hauptpeak (Plasmid-DNA) abgetrennt, in dem der Hauptpeak ab ansteigender Flanke in einem separaten Gefäß aufgefangen wird.

Anschließend wird eine Chromatographie an Hydroxylapatit (HA Ceramic) bei $5 \pm 4^\circ \text{C}$ durchgeführt.

Äquilibrierungspuffer: 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$.

Waschpuffer 1: 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$.

10 Waschpuffer 2: 0,02 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH $7,0 \pm 0,2$.

Elutionspuffer: 0,5 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$.

Die Detektion erfolgt bei 254 nm mit einer UV-Detektor/Schreibereinheit. Als Eichlösung wird eine 1 % Produktlösung (Plasmid-DNA), vermessen mit einem kalibrierten Photometer verwendet.

Der Q-Sepharose-Pool wird auf eine Endkonzentration von 1,1 mmol/l Calciumchlorid gebracht und auf die äquilibrierte Säule aufgezogen.

Dann wird die Säule bei einer Flußrate von 5-8 SV/h nacheinander gewaschen mit:

25

1. 0,1 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$, bis am Detektor keine Absorption mehr erkennbar ist.
2. 2-4 SV, 0,15 mol/l Kaliumphosphat, 6 mol/l Harnstoff pH $7,0 \pm 0,2$.
- 30 3. 5 SV, 0,02 mol/l Kaliumphosphat pH $7,0 \pm 0,2$.

Im Anschluß an die Waschschrirte wird mit 0,5 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH $7,0 \pm 0,1$ eluiert. Der Peak wird gesammelt und als Plasmid-DNA-Ausgangslösung in die CFF eingesetzt.

35

1.2 Cross-Flow-Filtration

Die Plasmid-DNA-Ausgangslösung hat eine Plasmid-DNA-Konzentration von ca. 200 µg/ml und ein Volumen von ca. 3750 ml. Die CFF wird mit einer Retentatdurchflußrate von 100-200 l/h·m², einem Transmembrandruck von ca. 0,8 bar und einem Überströmdruck von ca. 1,2 bar durchgeführt. Mit Hilfe der CFF wird das Volumen auf ca. 50 ml konzentriert und das Retentat anschließend gegen TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0) fließend diafiltriert, bis die Werte für pH und Leitfähigkeit von Retentat und TE-Puffer übereinstimmen. Nach Beendigung des Diafiltrationsvorganges wird das Retentat durch Verdünnung mit Diafiltrationspuffer auf eine Plasmid-DNA-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Eine Probe der erstellten Plasmid-DNA-Lösung wird entnommen und diese wie unter Punkt 3.1 beschrieben analysiert.

15

2. Messung der Endotoxinanreicherung nach CFF

Eine Plasmid-DNA-Lösung mit einem Volumen von 100 ml wird mit 1000 EU der E-Toxate® Endotoxinstandardlösung auf 10 EU/ml aufgestockt und darauf als Ausgangslösung im Experiment eingesetzt. Die Lösung wird mit TE-Puffer auf 1000 ml verdünnt und dann mit Hilfe der CFF wieder auf das Ausgangsvolumen von 100 ml konzentriert (Konzentrat 1). Der Verdünnungs- und Konzentrierungsschritt wird viermal hintereinander wiederholt. Nach jedem Konzentrierungsschritt wird aus dem jeweiligen Konzentrat eine Probe entnommen (Proben: Konzentrat 2, 3, 4, 5) und die Endotoxinkonzentration der Probe mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat Verfahren analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 CFF der Plasmid-DNA-Lösung

Die Plasmid-DNA-Lösung läßt sich mit Hilfe der CFF problemlos konzentrieren und diafiltrieren. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt.

Parameter	PLASMID-DNA-Ausgangslösung (HA-Pool)	PLASMID-DNA nach CFF	Diafiltrationspuffer (TE): 10 mmol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0
Volumen (ml)	3750	505	-
OD _{260/280}	1.89	1.90	-
Leitfähigkeit (mS/cm)	26.5	1.11	1.11
pH	6.99	7.93	7.98
Ausbeute (mg)	763	666	-

Ein Aliquot der Plasmid-DNA nach erfolgter CFF wird in verschiedenen Konzentrationen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das dargestellte Agarosegel zeigt in den Spuren 1 und 10 den DNA Längenstandard Nr. II (Fragmentgrößen: 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp) und in den Spuren 2 und 9 DNA Längenstandard Nr. III (Fragmentgrößen: 125, 564, 831, 647, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp). Als Vergleichsplasmid ist in Spur 3 pBR322 (4162bp) aufgetragen, das nach konventioneller Cäsiumchloridgradientenmethode aufgereinigt wurde. Es ist bekannt, daß nach dieser Methode gereinigte Plasmid-DNA im wesentlichen Plasmid-DNA enthält, die der Konformation "Covalently Closed Circle" (dominante "Supercoiled-Bande") entspricht. In den Spuren 4, 5 und 6 ist die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigte Plasmid-DNA (pCMV-CAT) in unterschiedlichen Mengen aufgetragen. Die erfindungsgemäß gereinigte Plasmid-DNA zeigt wie auch die Vergleichsplasmid-DNA (Spur 3) im wesentlichen eine dominante Bande. Diese Plasmid-DNA-Bande entspricht der Konformation "Covalently Closed Circle" (dominante "Supercoiled-Bande"). Dies zeigt, daß die erfindungsgemäß gewonnene Plasmid-DNA nicht geschädigt wird und in ihrer ursprünglichen Konformation erhalten bleibt. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die Plasmid-DNA während der CFF fragmentiert oder in eine unerwünschte Plasmid-DNA-Konformation überführt wird.

Legende:

1 %iges Agarosegel

- Spur 1: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 236250)
- Spur 2: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 528552)
- Spur 3: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238) (0,4 µg)
- Spur 4: pCMV-CAT nach CFF, 0,19 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 5: pCMV-CAT nach CFF, 0,45 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 6: pCMV-CAT nach CFF, 0,71 µg (Bulk-Wirkstofflösung)
- Spur 7: TE-Puffer
- Spur 8: pBR322 (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 481238) (0,4 µg)
- Spur 9: DNA-Längenstandard III (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 528552)
- Spur 10: DNA-Längenstandard II (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 236250)

3.2 Endotoxinabreicherung durch CFF

Die folgende Tabelle zeigt, daß die Endotoxine bereits nach dem ersten Konzentrierungsschritt weitgehend abgereinigt sind.
Die weitere CFF reduziert die Endotoxinkonzentration bis zur Nachweisgrenze der Testmethode.

Probe	Retentatvolumen [ml]	Gemessene Endotoxinkon- zentration im Retentat [EU/ml]
Ausgangslösung	100	6-12
10 Konzentrat 1	100	0,06-0,60
Konzentrat 2	100	0,06-0,60
Konzentrat 3	100	0,06-0,60
Konzentrat 4	100	0,06-0,60
Konzentrat 5	100	< 0,06
15 Diafiltrationspuffer	-	< 0,06

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von
5 Nucleinsäuren in einer Lösung,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an
einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeige-
leitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den
10 Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem
geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durch-
treten können, wobei eine gereinigte oder/und konzen-
trierte Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure Plasmid-DNA ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure eine Größe von ≥ 150 Basenpaaren
hat.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß eine Lösung mit einem Volumen von 1 - 10.000 l aufge-
arbeitet wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
35 daß eine Lösung mit einem Volumen von 1 - 100 l aufge-
arbeitet wird.

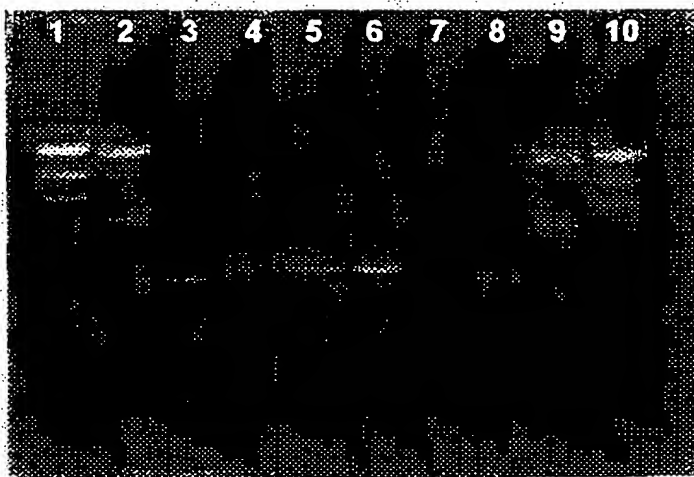
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Lösung unter Druck an der/den Membran(en) vorbeigeleitet wird, wobei der Überströmdruck größer als der Transmembrandruck ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß unter einem Transmembrandruck von 0,2 - 3,0 bar gearbeitet wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß mit einer Retentatfließrate von 100 - 4.000 l/h•m² gearbeitet wird.
10. Verfahren zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Nucleinsäure enthaltende Präparation tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeigeleitet wird, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und von der Membran adsorbiert werden, wobei eine im wesentlichen endotoxinfreie Nucleinsäure-Lösung erhalten wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Membran(en) eine Ausschlußgröße von 1 - 1000 kD hat/haben.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10
dadurch gekennzeichnet,
daß die Membran(en) eine Ausschlußgröße von 10 - 100 kD hat/haben.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Verfahren kontinuierlich durchgeführt wird.
- 5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Präparation mit einem Volumen von 1 - 10.000 l,
vorzugsweise 1 - 100 l aufgearbeitet wird.
- 10 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxinabreicherungsfaktor, Endotoxingehalt der
Präparation vor der Cross-Flow-Filtration (CFF) zu Endo-
toxingehalt der Lösung nach der CFF mindestens 10 : 1
15 beträgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxinabreicherungsfaktor mindestens 200 : 1
20 beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Endotoxingehalt der Lösung nach der Cross-Flow-
25 Filtration < 0,1 EU/mg Nucleinsäure aufweist.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die erhaltene Nucleinsäure im wesentlichen keine
30 Strangbrüche aufweist.
19. Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reini-
gung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in
einer Lösung.
- 35 20. Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Ab-
trennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präpara-

tion.

21. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Abbildung 1



PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/10, C07H 1/08, B01D 61/00</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/30685</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Juli 1998 (16.07.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00103</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Januar 1998 (09.01.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 97100331.4 10. Januar 1997 (10.01.97) EP</p> <p>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUHNE, Wolfgang [DE/DE]; Wolfbauerweg 10, D-82377 Penzberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Oktober 1998 (22.10.98)</p>	
<p>(54) Title: PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF DNA BY CROSS-FLOW FILTRATION, SEPARATION OF ENDOTOXINS FROM A NUCLEIC ACID PREPARATION</p> <p>(54) Bezeichnung: REINIGUNG ODER/UND KONZENTRIERUNG VON DNA DURCH CROSS-FLOW-FILTRATION, ABTRENNUNG VON ENDOTOXINEN AUS EINER NUCLEINSÄURE-PRÄPARATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method of purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution, the solution containing nucleic acid being guided tangentially past one or a plurality of semipermeable membranes, such that the nucleic acid molecules are retained by the membranes and substances having a lower molecular weight can pass through the membranes and/or be adsorbed thereat, so that a purified and/or concentrated nucleic acid solution is obtained. The same method is carried out to separate endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention further concerns the use of a cross-flow filtration system for purifying and/or concentrating nucleic acids in a solution and for separating endotoxins from a nucleic acid preparation. The invention also concerns the use of the nucleic acids purified and/or concentrated by the cross-flow filtration system for cloning, transformation, transfection and microinjection into cells, for use in gene therapy processes, DNA vaccination and/or for polymerase chain reaction (PCR).</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung, wobei man die Nucleinsäure enthaltende Lösung tangential an einer oder mehreren semipermeablen Membranen vorbeileitet, so daß die Nucleinsäure-Moleküle von den Membranen zurückgehalten werden und Substanzen mit einem geringeren Molekulargewicht durch die Membranen durchtreten können oder/und an der Membran adsorbiert werden und man eine gereinigte oder/und konzentrierte Nucleinsäure-Lösung erhält. In derselben Weise wird zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation verfahren. Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung einer Cross-Flow-Filtrationsanlage zur Reinigung oder/und zur Konzentrierung von Nucleinsäuren in einer Lösung sowie zur Abtrennung von Endotoxinen aus einer Nucleinsäure-Präparation. Ferner die Verwendung der mit der Cross-Flow-Filtration gereinigten oder/und konzentrierten Nucleinsäuren zum Klonieren, zur Transformation, zur Transfektion, zur Mikroinjektion in Zellen, zur Verwendung bei Verfahren der Gentherapie, der DNA-Vakzinierung oder/und zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/00103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C07H1/08 B01D61/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07H B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LITZÉN A ET AL: "Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 476, 1989, AMSTERDAM NL, pages 413-421, XP000676197 see page 418 - page 420 --- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 1998

Date of mailing of the international search report

07.07.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal J Application No

PCT/EP 98/00103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WAHLUND KG ET AL: "Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysaccharides and unicellular algae" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 461, 1989, AMSTERDAM NL, pages 73-87, XP000676196 see page 78 - page 81; figure 2 ---	1-19
X	FERNANDEZ VM ET AL: "Cross flow filtration of RNA extracts by hollow fiber membrane" ACTA BIOTECHNOLOGICA, vol. 12, 1992, BERLIN, DE, pages 49-56, XP000675220 see figures 3,4 ---	1,5-7, 10-14,19
A	REMBHOTKAR GW ET AL: "Large scale preparation of bacteriophage lambda by tangential flow ultrafiltration for isolation of lambda DNA" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 176, 1989, NEW YORK US, pages 373-374, XP002033662 see the whole document ---	1,5-7, 10-14,19
E	WO 98 05673 A (MEGABIOS CORP) 12 February 1998 see the whole document ---	1-21
X	EP 0 624 800 A (FRANCE ETAT) 17 November 1994 see the whole document ---	1,3-7, 10-14, 18-20
A	WO 96 02658 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 1 February 1996 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 98/00103

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claim 21 relates to a method for the treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/00103

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9805673	A	12-02-1998	AU	4049097 A	25-02-1998
EP 0624800	A	17-11-1994	FR	2705251 A	25-11-1994
WO 9602658	A	01-02-1996	AU	3126295 A	16-02-1996
			CA	2192342 A	01-02-1996
			EP	0771355 A	07-05-1997
			JP	10503086 T	24-03-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00103

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/10 C07H1/08 B01D61/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07H B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LITZÉN A ET AL: "Improved separation speed and efficiency for proteins, nucleic acids and viruses in asymmetrical flow field flow fractionation" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 476, 1989, AMSTERDAM NL, Seiten 413-421, XP000676197 siehe Seite 418 - Seite 420 --- -/-	1-19

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"S" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07.07.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/00103

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WAHLUND KG ET AL: "Application of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel to the separation and characterization of proteins, plasmids, plasmid fragments, polysacharides and unicellular algae"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 461, 1989, AMSTERDAM NL, Seiten 73-87, XP000676196 siehe Seite 78 - Seite 81; Abbildung 2</p> <p>---</p>	1-19
X	<p>FERNANDEZ VM ET AL: "Cross flow filtration of RNA extracts by hollow fiber membrane"</p> <p>ACTA BIOTECHNOLOGICA, Bd. 12, 1992, BERLIN, DE, Seiten 49-56, XP000675220 siehe Abbildungen 3,4</p> <p>---</p>	1,5-7, 10-14,19
A	<p>REMBHOTKAR GW ET AL: "Large scale preparation of bacteriophage lambda by tangential flow ultrafiltration for isolation of lambda DNA"</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 176, 1989, NEW YORK US, Seiten 373-374, XP002033662 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,5-7, 10-14,19
E	<p>WO 98 05673 A (MEGABIOS CORP) 12.Februar 1998 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-21
X	<p>EP 0 624 800 A (FRANCE ETAT) 17.November 1994 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,3-7, 10-14, 18-20
A	<p>WO 96 02658 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 1.Februar 1996</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/00103

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. _____
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 21 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 98/00103

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9805673	A	12-02-1998	AU	4049097 A	25-02-1998
EP 0624800	A	17-11-1994	FR	2705251 A	25-11-1994
WO 9602658	A	01-02-1996	AU	3126295 A	16-02-1996
			CA	2192342 A	01-02-1996
			EP	0771355 A	07-05-1997
			JP	10503086 T	24-03-1998